Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 5, Dec- Jan 2022, p. 603-614

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۱ ص.۶۱۴-۶۰۳

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Full Research Paper

Determination of chemical composition and evaluation the antimicrobial activity of *Olea europaea* leaf extract against pathogenic bacteria *"in vitro"*

Behrooz Alizadeh Behbahani[*1], **Mohammad Noshad**[2], **Mostafa Rahmati-Joneidabad**[3]

Received: 2021.12.13
Revised: 2022.01.28
Accepted: 2022.02.07
Available Online: 2022.02.07

How to cite this article:
Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. Rahmati-Joneidabad, M. (2022). Determination of chemical composition and evaluation the antimicrobial activity of *Olea europaea* leaf extract against pathogenic bacteria *"in vitro"*. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 603-614.

Abstract

Introduction: Oxidation and food pathogens are considered two important and influential factors affecting food quality and health. Recently, due to the increasing demand for natural products, the application of synthetic preservatives to control microbial growth and lipid oxidation have been decreased significantly. Therefore, natural antioxidant and antimicrobial compounds are receiving more attention in food preservation technologies. In the last 2 decades, the use of herbal medicines rich in bioactive molecules (including polyphenols, carotenoids and flavonoids) with medicinal and health effects such as delaying the onset of some diseases such as cardiovascular disorders, diabetes, and cancer have increased. Furthermore, secondary metabolites in plant extracts and essential oils are able to control and inhibit free radical-mediated reactions. The olive tree (*Olea europaea*) is an evergreen plant that grows in tropical and subtropical regions. Iran is one of the most important olive growers in the world due to its suitable conditions for olive cultivation. The leaves of the olive plant have a high potential for the production of various products such as tea and extracts. Olive leaf extract can be used as a raw material in the production of various products, due to exhibiting various biological activities such as antimicrobial and antiviral activity, lipid stabilizer, blood pressure regulator, antioxidant activity, and free radical scavenger. The leaves of the olive tree also contain various phenolic compounds, mainly Oleuropein and hydroxytyrosol, with antioxidant and antimicrobial activities. Therefore, in this study, the amount of phenolic and flavonoid compounds of olive leaf ethanolic extract and its antioxidant effect and antimicrobial properties on *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenesis*, *Bacillus cereus* and *Listeria innocua* were investigated.

Materials and Methods: The olive leaf ethanolic extract was prepared through maceration method and its total phenolic content (Folin-Ciocalteu method), total flavonoids content (aluminum chloride colorimetric assay), antioxidant activity (ABTS and DPPH free radical scavenging methods), and antimicrobial effect on *E. coli*, *E. aerogenesis*, *B. cereus* and *L. innocua* (based on disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration) were determined according to standard methods. Data were analyzed by SPSS software through one-way ANOVA and Duncan test at $p<0.05$.

Results and Discussion: The ethanolic extract of olive leaves contained 176.58 ± 0.72 mg GAE/g total phenol and 69.85 ± 0.26 mg QE/g total flavonoids. In addition, ethanolic extract of olive leaf was able to inhibit free radicals DPPH (70.62 ± 0.59%) and ABTS (76.15 ± 0.43%). The antimicrobial results showed that the antimicrobial effect of the extract depended on its concentration and type of bacteria. Antimicrobial effect was increased as a function of ethanolic extract,

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
(*Corresponding Author Email: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74472.1130

and Gram-positive bacteria (*B. cereus* and *L. innocua*) were more sensitive to ethanolic extract of olive leaf than Gram-negative bacteria (*E. aerogenesis* and *E. coli*). Generally, *B. cereus* and *E. aerogenesis* were the most sensitive and resistant microbial strains to ethanolic extract of olive leaf, respectively.

The results of this study showed that the high antioxidant and antimicrobial activity of olive leaf ethanolic extract is mainly due to its phenolic and flavonoid compounds. Olive leaf ethanolic extract was able to neutralize DPPH and ABTS free radicals. Also, Gram-positive bacteria were more sensitive to ethanolic extract of olive leaf than Gram-negative bacteria. In general, the ethanolic extract of olive leaf can be used as a nutraceutical to control or prevent the growth of spoilage/infection-causing microorganisms and free radical reactions in food and the human body. However, more in-depth studies are needed to determine the mechanism of antimicrobial and antioxidant effects of olive ethanolic extract *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Olive leaf; Ethanolic extract; Antimicrobe; Antioxidant; Natural preservative.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 5, Dec- Jan 2022, p. 603-614

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۱ ص.۶۱۴-۶۰۳

مقاله علمی-پژوهشی

تعیین ویژگی‌های شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ زیتون بر باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی

بهروز علیزاده بهبهانی[1*]- محمد نوشاد[2]- مصطفی رحمتی جنیدآباد[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

چکیده

این مطالعه پژوهشی با هدف استخراج عصاره اتانولی برگ زیتون (*Olea europaea*) و بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن صورت گرفت. عصاره اتانولی برگ زیتون با کمک روش خیساندن تهیه شد و محتوای فنول و فلاونوئید کل بر اساس روش‌های رنگ‌سنجی معرف فولین- سیوکالتو و کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری گردید. پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره با روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS ارزیابی شد. علاوه بر این، فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون در برابر باکتری‌های بیماری‌زا (*اشرشیا کلی*، *انتروباکتر ائروژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا اینوکوا*) بر پایه روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید. عصاره اتانولی برگ زیتون حاوی ۱۷۶/۵۸± ۰/۷۲ mg GAE/g فنول کل و ۶۹/۸۵± ۰/۲۶ mg QE/g فلاونوئید کل بود. علاوه بر این، عصاره اتانولی برگ زیتون قادر به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (۷۰/۶۲± ۰/۵۹ درصد) و ABTS (۷۶/۱۵± ۰/۴۳ درصد) بود. نتایج ضدمیکروبی نشان داد اثر ضدمیکروبی عصاره وابسته به غلظت آن و نوع باکتری است و باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *انتروباکتر ائروژنز* به‌ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های میکروبی در برابر عصاره اتانولی برگ زیتون بودند. به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی برگ زیتون را می‌توان به‌عنوان ترکیب زیست فعال طبیعی با ویژگی‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالا معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: برگ زیتون، عصاره اتانولی، ضدمیکروب، آنتی‌اکسیدان، نگهدارنده طبیعی.

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های جدید در صنایع غذایی، امروزه بهداشت و ایمنی مواد غذایی از جمله مسائل مورد توجه مصرف‌کنندگان، تولیدکنندگان و سازمان‌های نظارتی می‌باشد (Barzegar et al., 2017). اکسیداسیون و پاتوژن‌های غذایی دو فاکتور مهم و تأثیرگذار در کیفیت و سلامت مواد غذایی به شمار می‌آیند (Barzegar et al., 2020). اخیراً، به دلیل افزایش تمایل به محصولات طبیعی، استفاده از نگهدارنده‌های مصنوعی جهت کنترل رشد میکروبی و اکسیداسیون لیپیدها به میزان قابل‌توجهی کاهش یافته است. بنابراین، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی طبیعی بیش از پیش مورد توجه تحقیقات و صنعتی در فناوری‌های نگهداری مواد غذایی قرار می‌گیرند (Kiarsi et al., 2020). در دو دهه اخیر، استفاده از داروهای گیاهی به‌عنوان ترکیبات غنی از مولکول‌های زیست فعال (از جمله پلی‌فنول‌ها، کارتنوئیدها و فلاونوئیدها) و با اثرات دارویی و سلامتی‌بخش مانند تأخیر در شروع برخی از بیماری‌ها مانند اختلالات قلبی عروقی، دیابت و سرطان افزایش یافته است (Alizadeh Behbahani et al., 2020). همچنین متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی قادر به کنترل و مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشند (Tabatabaei Yazdi et al., 2018).

درخت زیتون با نام علمی *Olea europaea* از تیره *Oleaceae* گیاهی همیشه سبز با ارتفاع حدود ۵ متر بوده که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری رشد می‌کند (Najafian et al., 2007; Abbas

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74472.1130

(Vali et al., 2015). ایران به دلیل دارا بودن شرایط مناسب برای کشت زیتون، از مهم‌ترین تولیدکنندگان زیتون در جهان به شمار می‌آید. برگ گیاه زیتون پتانسیل بالایی برای تولید محصولات گوناگونی مانند چای و عصاره می‌باشد. عصاره برگ گیاه زیتون به دلیل فعالیت بیولوژیکی مختلف مانند فعالیت ضدمیکروبی و ضدویروس، پایدارکننده لیپید، تنظیم‌کننده فشارخون و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد می‌تواند به‌عنوان یک ماده خام در تولید محصولات مختلف مورد استفاده قرار گیرد. همچنین برگ‌های درخت زیتون حاوی ترکیبات فنولی مختلف می‌باشد. از جمله بیشترین ترکیبات فنولی موجود در برگ درخت زیتون می‌توان به الئوروپین و هیدروکسی تیروزول اشاره کرد (Mallakian et al., 2019). الئوروپین و سایر ترکیبات فنولی موجود در عصاره برگ زیتون مانند اسید فرولیک، اسید پاراهیدروکسی بنزوئیک، کوئرستین، تیروزول و غیره دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشند (Abbas Vali et al., 2015). فعالیت ضدمیکروبی چهار رقم زیتون بومی ایران بر باکتری *اشرشیا کلی* گزارش شده است (Abbas Vali et al., 2015). همچنین Abbas Vali و همکاران (۲۰۱۵) اثر ضد میکروبی عصاره برگ چهار رقم زیتون بر باکتری *باسیلوس سرئوس* را گزارش کردند (Abbas Vali et al., 2015). علاوه بر این، Aghajani و Khabarizadeh (۲۰۱۵) خاصیت آنتی‌اکسیدانی برگ ۲ رقم زیتون (کنسرولیا و میشین) به روش مهار رادیکال آزاد DPPH[1] را بررسی کردند. در این پژوهش میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره اتانولی برگ گیاه زیتون و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از جمله *اشرشیا کلی*، *انتروباکتر ائروژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا اینوکوا* بررسی شد (Aghajani and Khabarizadeh, 2015).

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل محیط‌های کشت مولر هینتون براث[2]، مولر هینتون آگار[3] و ۲- ۳- ۵ تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید[4] (مرک، آلمان)، رادیکال آزاد ABTS[5]، رادیکال آزاد DPPH، معرف فولین–سیوکالتو[6] (سیگما، آمریکا) بودند.

تهیه عصاره اتانولی برگ گیاه زیتون

از روش خیساندن به‌منظور تهیه عصاره اتانولی برگ گیاه زیتون استفاده شد. بدین ترتیب که، ابتدا برگ‌های گیاه به مدت ۷۲ h در دمای محیط در سایه خشک گردید. پس از آسیاب، ۵۰ g از برگ‌های پودر شده به ۲۵۰ mL اتانول اضافه و ۷۲ h در انکوباتور شیکردار همزده شد. همزدن با سرعت ثابت انجام شد تا حلال به‌طور مؤثر و کامل با ترکیبات موجود در پودر برهمکنش دهد و درصد ترکیبات در عصاره تولیدی بالا رود. پس از صاف کردن عصاره با کاغذ صافی واتمن، شفاف‌سازی با استفاده از سانتریفوژ در سرعت ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min انجام شد. استریل نمونه با اشعه UV و حذف حلال با استفاده از اواپراتور تحت خلأ صورت گرفت. عصاره تهیه شده در ظروف دارای فویل آلومینیومی و دور از نور و در دمای ۴°C در یخچال نگهداری شد (Tabatabaei Yazdi et al., 2016).

تعیین فنول کل

روش فولین- سیوکالچو به‌منظور تعیین فنول کل مورد استفاده گرفت. در این آزمون، ۲۰ µL عصاره به ۱۰۰ µL معرف فولین–سیوکالچو و ۲ mL آب اضافه شد. محلول به مدت ۳ min نگهداری و سپس ۳۰۰ µL محلول سدیم کربنات به آن اضافه گردید. پس از هم زدن محلول به مدت ۲ h جذب آن در طول‌موج ۷۶۵ nm اندازه‌گیری شد. از گالیک اسید جهت تهیه نمودار استاندارد استفاده شد. مقدار فنول کل بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک عصاره (mg GAE/g) گزارش گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2019).

اندازه‌گیری فلاونوئید کل

در این روش ۱ mL عصاره با ۱/۲۵ mL آب مقطر مخلوط گردید. سپس ۷۵ µL نیتریت سدیم (۵ درصد) به آن اضافه شد. پس از گذشت ۵ min، ۱۵۰ µL آلومینیوم تری کلرید (۱۰ درصد) به آن اضافه گردید. سپس ۱ mL سود به آن اضافه شد. پس از ۵ min جذب نمونه در طول‌موج ۵۱۰ nm اندازه‌گیری گردید. منحنی استاندارد با استفاده از محلول کوئرستین رسم گردید و از آب مقطر به‌عنوان شاهد استفاده شد (Sosani Gharibvand et al., 2020).

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH

در این روش ۱ mL عصاره با ۱ mL محلول DPPH (۰/۲ mM در اتانول) مخلوط گردید. پس از ۳۰ min در دمای اتاق جذب آن در طول‌موج ۵۱۷ nm اندازه‌گیری شد. به جای عصاره از آب مقطر جهت

1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
2 Mueller hinton broth
3 Mueller hinton agar
4 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride
5 (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))
6 Folin-Ciocalteu reagent

تهیه نمونه کنترل استفاده شد. قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH عصاره طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2020):

$$(\%) \text{ DPPH -RS فعالیت} = (1 - A_{\text{نمونه}} / A_{\text{کنترل}}) \times 100 \qquad (1)$$

روش مهار رادیکال آزاد ABTS

مقادیر یکسانی از ABTS (۷ mM) و پتاسیم پرسولفات (mM ۲/۴۵) جهت تولید رادیکال‌های آزاد ABTS با یکدیگر مخلوط و به مدت ۱۶ h در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شدند. از متانول جهت رقیق‌سازی رادیکال‌های کاتیونی ABTS تولید شده تا رسیدن به جذب ۰/۰۲ ± ۰/۷ در طول‌موج ۷۳۴ nm استفاده گردید. سپس ۳/۹ mL محلول کاتیونی رادیکال ABTS با ۰/۱ mL عصاره (جذب نمونه) یا متانول (جذب کنترل) مخلوط و جذب آن‌ها در ۷۳۴ nm ثبت گردید. مهار رادیکال آزاد ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Barzegar et al., 2020):

$$(\%) \text{ ABTS-RS فعالیت} = (1 - A_{\text{نمونه}} / A_{\text{کنترل}}) \times 100 \qquad (2)$$

تعیین خاصیت ضدمیکروبی

دیسک دیفیوژن آگار

پس از استریل غلظت‌های مختلف عصاره (۱۵، ۳۰، ۴۵ mg/mL و ۶۰) با استفاده از فیلترهای ۲۲ میکرومتری، دیسک‌های بلانک به مدت ۱۵ min در غلظت‌های مختلف عصاره نگهداری شدند. در مرحله بعد سوسپانسیون‌های میکروبی مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند (طول موج ۶۲۵ نانومتری جذبی برابر با ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ دارد) روی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و دیسک‌ها روی محیط تثبیت شدند. پس از گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C قطر هاله‌های عدم رشد اطراف هر یک از دیسک‌ها اندازه‌گیری گردید (Noshad et al., 2018).

چاهک آگار

به‌طور خلاصه، پس از ایجاد چاهک‌هایی با قطر ۶ mm و کشت سطحی باکتری‌ها روی محیط‌های مولر هینتون آگار از هر یک از غلظت‌های تهیه شده در چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C شدند و قطر هاله‌های عدم رشد اطراف چاهک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و گزارش شد (Alizadeh Behbahani et al., 2021).

حداقل غلظت مهارکنندگی

پس از تهیه غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ گیاه زیتون (۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ mg/mL)، ۱۰۰ µL از هر یک از رقت‌های استریل شده به میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. سپس ۱۰ µL از سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم مک‌فارلند) به چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C، ۱۰ µL معرف تری فنل تترازولیوم (۵ mg/mL) اضافه گردید. کمترین غلظتی از عصاره که مانع از رشد باکتری شده و هیچگونه تغییر رنگی در آن مشاهده نشد، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2020).

حداقل غلظت کشندگی

به‌طور خلاصه در این روش، ۱۰۰ µL از چاهک‌های فاقد رنگ قرمز (در آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی) در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ h در دمای ۳۷ °C، اولین غلظت فاقد هیچگونه رشد روی محیط مولر هینتون آگار به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (Alizadeh Behbahani and Shahidi, 2019).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

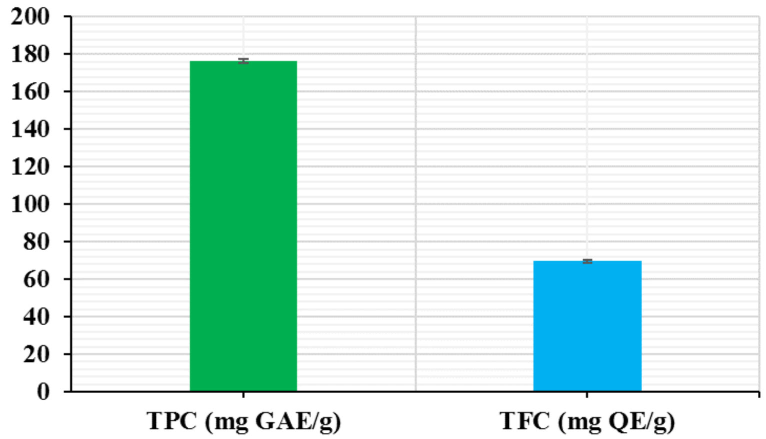
از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه جهت تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0.05$) انجام شد.

نتایج و بحث

فنول و فلاونوئید کل

گیاهان دارویی دارای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مختلفی می‌باشند. پلی‌فنول‌ها ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌باشند که سبب جذب رادیکال‌های آزاد و خنثی‌سازی آن‌ها می‌شوند. این ترکیبات در محافظت از بدن در برابر استرس اکسیداتیو و سرطان‌های پرستات سینه، روده بزرگ و پوست نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Noktehsanj Avval et al., 2018). محتوای فنول کل و فلاونوئید کل عصاره اتانولی برگ زیتون در شکل ۱، آورده شده است. عصاره اتانولی حاوی ۱۷۶/۵۸± ۰/۷۲ mg GAE/g فنول کل و ۶۹/۸۵± ۰/۲۶ mg QE/g فلاونوئید کل بود. الئوروپین به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب فنولی برگ زیتون شناخته می‌شود و سایر ترکیبات فنولی از قبیل فرولیک اسید، وانیلیک اسید، پاراهیدروکسی بنزوئیک، سینرژیک اسید، پروکاتکولیک، پاراکوماریک اسید، تیروزول، کولرستین، النولیک اسید و هیدروکسی تیروزول در برگ زیتون شناسایی شده‌اند که دارای فعالیت ضدمیکروبی

و آنتی‌اکسیدانی بالقوه‌ای می‌باشند (Del Río et al., 2003; Majeed and Prakash, 2006; Romani et al., 2019). Jafarian و همکاران (۲۰۱۴) میزان فنول کل عصاره متانولی برگ واریته‌های مختلف زیتون (مغان، طارم، نور و رودبار) را به‌ترتیب ۵۲/۵، ۸۰، ۵۷/۵ و ۷۴/۵ mg GAE/g گزارش نمودند (Jafarian et al., 2014). در مطالعه Hayes و همکاران (۲۰۱۱) مشخص گردید که عصاره برگ زیتون حاوی ۱۶۰ فنول کل می‌باشد (Hayes et al., 2011). Kiritsakis و همکاران (۲۰۱۰) محتوای فنول کل برگ‌های زیتون سه واریته *O. koroneiki*، *O. kalamon* و *O. megaritiki* را به ترتیب ۶۱/۹ mg GAE/g، ۵۵/۷ و ۶۰/۹ گزارش نمودند (Kiritsakis et al., 2010). علاوه بر این، Lins و همکاران (۲۰۱۸) بیان داشتند که عصاره متانولی برگ زیتون حاوی ۱۳۱/۷ mg GAE/g فنول کل و ۱۹/۴ mg QE/g فلاونوئید کل می‌باشد (Lins et al., 2018). نتایج این مطالعه با گزارش‌های سایر محققین مطابقت دارد؛ با این حال، تفاوت‌های جزئی در میزان ترکیبات پلی فنولی در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط استخراج، نوع حلال، واریته گیاه و شرایط کشت، داشت و برداشت باشد (Alizadeh Behbahani et al., 2018; Falah et al., 2021).

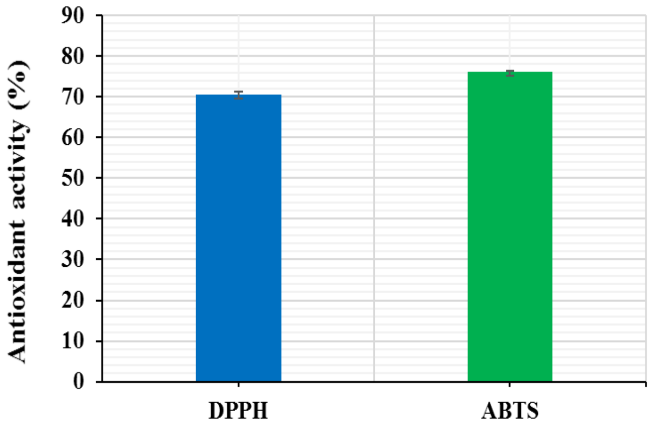


شکل ۱- محتوای فنول کل (TPC) و فلاونوئید کل (TFC) عصاره اتانولی برگ زیتون.
Fig. 1. Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of olive leaf ethanolic extract.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ترکیبات پلی‌فنولی نقش بسیار مهمی در بروز فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی ایفا می‌کنند. مطابق نتایج (شکل ۲)، عصاره اتانولی برگ زیتون بطور مؤثری سبب مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (۰/۵۹ ±۷۰/۶۲ درصد) و ABTS (۰/۴۳ ±۷۶/۱۵ درصد) گردید که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی عصاره را بازگو می‌کند. قابلیت عصاره برگ زیتون در مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH در مطالعات مختلف گزارش شده است (Benavente-Garcıa et al., 2000; Silva et al., 2006). Hayes و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی لوتئین، سزامول، الاجیک اسید و عصاره متانولی برگ زیتون گزارش نمودند که قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات از روند الاجیک اسید >سزامول >عصاره برگ زیتون >لوتئین پیروی می‌نماید (Hayes et al., 2011). گزارش شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ زیتون ممکن است ناشی از حضور گروه‌های هیدروکسیل در ساختار ترکیبات موجود در عصاره شامل الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و لوتئولین-۷-O-گلوکوزید اسید باشد (Benavente-Garcıa et al., 2000). Noktehsanj Avval و همکاران (۲۰۱۸) گزارش نمودند که عصاره آبی برگ زیتون قابلیت حفظ رنگدانه لیکوپن و ویتامین C در نوشیدنی آب گوجه‌فرنگی پالپدار طی زمان نگهداری را دارا می‌باشد و این اثر به فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی عصاره نسبت داده شد که سبب مهار رادیکال‌های آزاد، تأخیر واکنش اکسیداسیون و بقای بیشتر ترکیبات زیست فعال در محصول می‌گردد (Noktehsanj Avval et al., 2018). در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که افزودن برگ زیتون واریته طارم به روغن کلزا به‌طور معنی‌داری سبب افزایش پایداری اکسایشی آن می‌گردد و این اثر به محتوای فنول بالای برگ زیتون مرتبط دانسته شد (Jafarian et al., 2014). Lins و همکاران (۲۰۱۸) غلظت مؤثر عصاره متانولی برگ زیتون در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS را به‌ترتیب ۱۳/۸ و ۱۶/۱ µg/mL گزارش نمودند (Lins et al., 2018). Lee و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی در عصاره برگ زیتون (الئوروپین، روتین، وانیلین و کافئیک اسید) را بصورت جداگانه یا ترکیبی، بر پایه مهار رادیکال آزاد DPPH، بررسی نمودند. این محققین بیان داشتند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی از ترتیب کافئیک اسید (۸۵/۷ درصد) >ترکیب فنولها (۵۸/۱ درصد) ≤روتین (۵۷ درصد) >الئوروپین

(۵۵ درصد) >وانیلین (۵/۸ درصد) برخوردار می‌باشد (Lee and Lee, 2010). به دلیل ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره برگ زیتون با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه، این ترکیب زیست فعال را می‌توان جهت کنترل واکنش‌های اکسیداسیون در مواد غذایی حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع استفاده نمود.



شکل ۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه مهار رادیکال DPPH و ABTS.
Fig. 2. Antioxidant activity of olive leaf ethanolic extract based on inhibition of DPPH and ABTS radicals.

فعالیت ضدمیکروبی

شکل ۳، نتایج فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه روش دیسک دیفیوژن آگار را نشان می‌دهد. همانطور که از نتایج مشخص است، اثر ضدمیکروبی عصاره وابسته به غلظت و نوع باکتری بود. افزایش غلظت عصاره از ۱۵ mg/mL تا ۶۰ سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد گردید. تأثیر عصاره اتانولی بر باکتری‌های مورد مطالعه متفاوت بود و باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس سرئوس* و *لیستریا اینوکوا*) نسبت به انواع گرم منفی (*انتروباکتر ائروژنز* و *اشرشیا کلی*) حساس‌تر بودند. در غلظت ۶۰ mg/mL عصاره، بالاترین قطر هاله عدم رشد در باکتری *باسیلوس سرئوس* (۱۵/۸۰ mm؛ حساس‌ترین باکتری) و کمترین قطر هاله عدم رشد در باکتری *انتروباکتر ائروژنز* (۱۳/۶۰ mm؛ مقاوم‌ترین باکتری) مشاهده گردید.

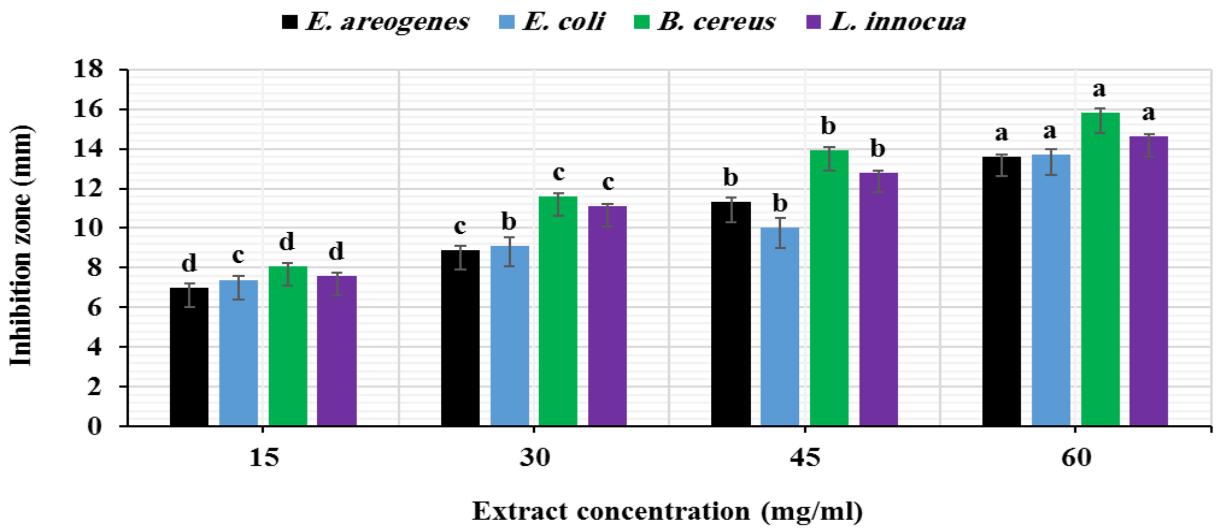
مطابق نتایج ضدمیکروبی بر پایه روش چاهک آگار (شکل ۴)، قطر هاله عدم رشد بطور معنی‌داری با افزایش غلظت عصاره اتانولی برگ زیتون افزایش یافت و باکتری‌های گرم مثبت نسبت به انواع گرم منفی در برابر عصاره حساس‌تر بودند. به‌طوریکه باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *انتروباکتر ائروژنز* به ترتیب بیشترین (۱۶/۶۰ mm) و کمترین (۱۳/۸۰ mm) قطر هاله عدم رشد را در غلظت ۶۰ mg/mL عصاره اتانولی برگ زیتون به خود اختصاص دادند. علاوه بر این، قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن آگار بالاتر بود.

نتایج فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر اساس روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد در شکل ۵ ارائه شده است. باکتری *باسیلوس سرئوس* با ۸ mg/mL و باکتری‌های *انتروباکتر ائروژنز* و *اشرشیا کلی* با ۳۲ mg/mL به‌ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها در برابر عصاره برگ زیتون بودند که در راستای نتایج حاصل از روش‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار می‌باشد.

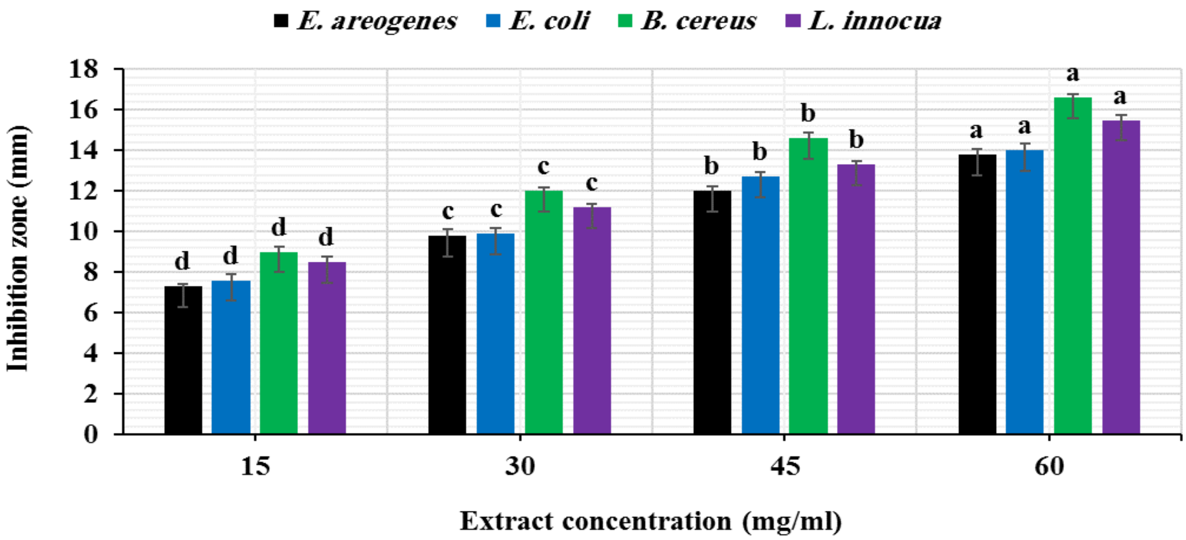
مطابق نتایج روش حداقل غلظت کشندگی، غلظت کمتری از عصاره اتانولی برگ زیتون (۱۲۸ mg/mL) جهت از بین بردن باکتری *باسیلوس سرئوس* مورد نیاز بود؛ در حالیکه باکتری *انتروباکتر ائروژنز* مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره بود و غلظت ۵۱۲ mg/mL برای از بین بردن آن نیاز بود. لازم به ذکر است که مقادیر حداقل غلظت کشندگی بالاتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود.

در راستای نتایج این مطالعه، گزارش شده است که مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی در برابر عصاره اتانولی برگ زیتون نسبت به انواع گرم مثبت احتمالاً ناشی از حضور غشاءهای خارجی اطراف غشاء سلولی این نوع از باکتری‌ها می‌باشد که با کاهش سرعت نفوذ ترکیبات آبگریز موجود در عصاره و اسانس‌های گیاهی به داخل سلول، منجر به افزایش مقاومت آن‌ها نسبت به مواد ضدمیکروبی می‌گردد (Alizadeh Behbahani et al., 2017; Alizadeh Behbahani et al., 2013; Alizadeh Behbahani et al., 2019; Tabatabaei Yazdi & Alizadeh Behbahani., 2013; Alizadeh Behbahani et al., 2018). Lee و همکاران (۲۰۱۰)، با بررسی فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات فنولی در عصاره برگ زیتون (الئوروپین، روتین، وانیلین و کافئیک اسید) بصورت جداگانه یا ترکیبی، بر پایه روش دیسک دیفیوژن آگار، نشان دادند که اثر ضدمیکروبی مخلوط ترکیبات فنولی بطور معنی‌داری بالاتر از ترکیبات بصورت جداگانه بود که بیانگر اثر

سینرژیستی بین ترکیبات فنولی در عصاره برگ زیتون می‌باشد (Lee and Lee, 2010).



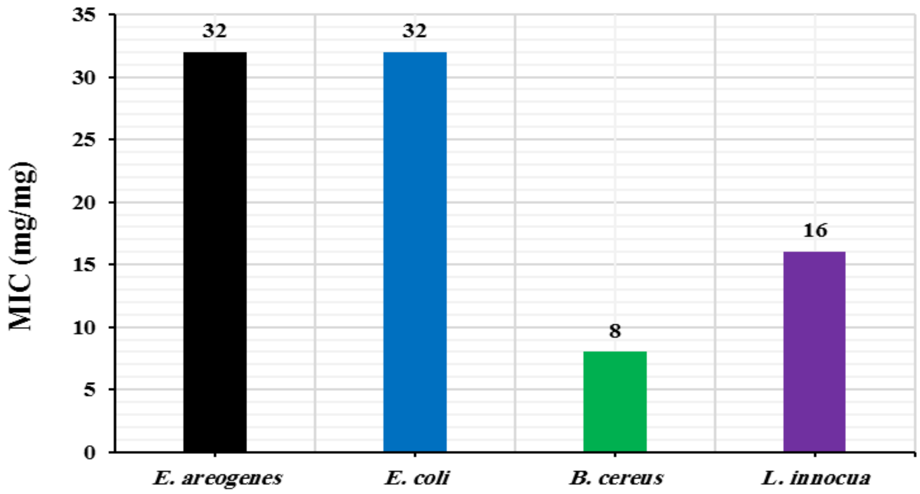
شکل ۳- فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه روش دیسک دیفیوژن آگار.
Fig. 3. Antimicrobial activity of olive leaf ethanolic extract based on agar disk diffusion assay.



شکل ٤- فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه روش چاهک آگار.
Fig. 4. Antimicrobial activity of olive leaf ethanolic extract based on agar well diffusion assay.

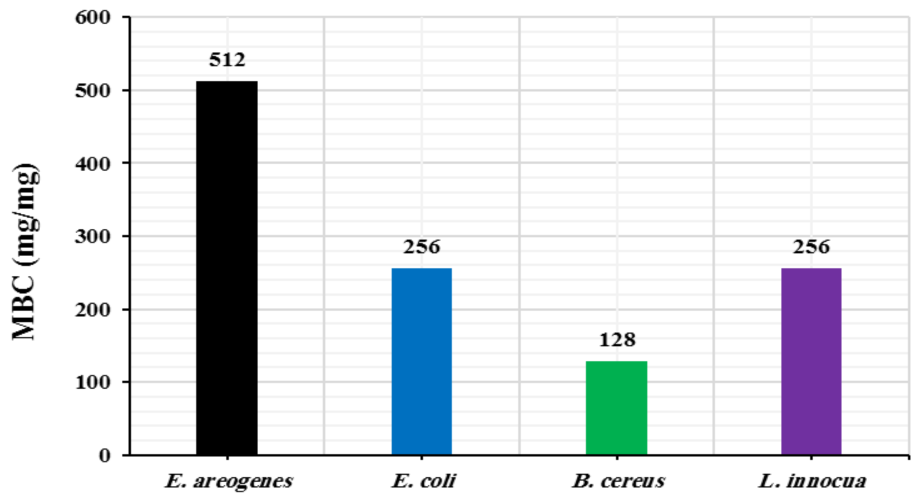
Keramatjou و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که افزودن عصاره برگ زیتون به کره سبب مهار رشد میکروارگانیسم‌های سرماگرا طی زمان نگهداری می‌گردد که این امر ناشی از حضور ترکیبات فنولی در عصاره استفاده شده می‌باشد (Keramatjou et al., 2013). Rafiee و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر روش‌های غرقابی و مایکروویو و نوع واریته را بر ویژگی‌های ضدمیکروبی عصاره برگ‌های زیتون در برابر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* را بررسی نمودند. این محققین گزارش دادند که فعالیت ضدمیکروبی عصاره حاصل از روش مایکروویو بالاتر می‌باشد و این اثر به میزان بالای ترکیبات فنولی استخراج شده در این روش نسبت داده شد (Rafiee et al., 2011). Pereira و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی برگ زیتون بر باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*)، گرم منفی (*سودوموناس ائروژینوزا*، *اشرشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیا*) و قارچ (*کاندیدا آلبیکنس* و *کریپتوکوکوس نئوفورمانس*) نشان دادند که عصاره قادر به جلوگیری از رشد تمامی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه می‌باشد و *باسیلوس سرئوس* و *کاندیدا*

آلبیکنس حساس‌ترین گونه‌ها نسبت به عصاره بودند که در راستای نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. این محققین اثر ضدمیکروبی عصاره را به حضور مقادیر بالای الئوروپین و دیگر ترکیبات فنولی در عصاره نسبت دادند (Pereira et al., 2007). علاوه بر این، ثابت شده است که الئوروپین و هیدروکسی تیروزول قادر به جلوگیری از رشد و یا کند کردن رشد باکتری‌های بیماری‌زای مجاری تنفسی و روده انسان می‌باشند (Bisignano et al., 1999). با توجه به نتایج، استفاده از عصاره برگ زیتون ممکن است خطر رشد میکروبی و عفونت/مسمومیت میکروبی در مواد غذایی و مجاری تنفسی و گوارشی را کاهش دهد.



شکل ۵- فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد.

Fig. 5. Antimicrobial activity of olive leaf ethanolic extract based on the minimum inhibitory concentration (MIC).



شکل ٦- فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه روش حداقل غلظت کشندگی.

Fig. 6. Antimicrobial activity of olive leaf ethanolic extract based on the minimum bactericidal concentration (MBC).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بالای عصاره اتانولی برگ زیتون عمدتاً ناشی از حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در آن می‌باشد. عصاره اتانولی برگ زیتون قادر به خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بود. همچنین، باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس سرئوس* و *لیستریا اینوکوا*) در برابر عصاره اتانولی برگ زیتون نسبت به باکتری‌های گرم منفی (*انتروباکتر ائروژنز* و *اشرشیا کلی*) حساس‌تر بودند. به‌طور کلی، عصاره اتانولی برگ زیتون قابلیت استفاده بعنوان غذاداروی طبیعی برای کنترل یا جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مولد فساد/ عفونت و واکنش‌های رادیکالی

در مواد غذایی و بدن انسان را دارا می‌باشد. با اینحال، مطالعات بیشتر و عمیق‌تری جهت تعیین مکانیسم اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی زیتون در شرایط آزمایشگاهی و درون بدنی نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Abbas Vali, M., Esmaili Kutmehr, M., Mushtaghi, H., & Eskandari, M. (2015). Comparison of the antibacterial effect of the leaf extracts of four varieties of olive (*Olea europaea*) on *Bacillus cereus*. *Food Hygiene*, 5(2), 41-52.
2. Abbas Vali, M., Esmaili Kutmehr, M., Mushtaghi, H., & Eskandari, M. (2015). Investigating the antibacterial effect of acetone, ethanol and methanol extracts of four Iranian olive varieties on *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 2(2), 67-77.
3. Aghajani, Z., & Khabarizadeh, M. (2015). The antioxidant activity of two varieties of olive leaves (Mission and Conservalia). *Scientific Research Applied Biology*, 5(18), 1-8.
4. Alizadeh Behbahani, B., & Shahidi, F. (2019). *Melissa officinalis* essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. *Nutrition and Food Sciences Research*, 6(1), 17-25.
5. Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., & Tabatabaee Yazdi, F. (2020). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of Cinnamomum zeylanicum bark essential oil. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2020.
6. Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaee Yazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil .*Food Science & Nutrition*, , *9*(5), 2458-2467. https://doi.org/10.1002/fsn3.2186
7. Alizadeh Behbahani, B., Fallah, F., Ehaghi, A., Tabatabai Yazdi, F., & Mortazavi, S. (2019). Antimicrobial effect of *Citrus aurantium* essential oil on some food borne pathogens and determination of its chemical compounds, total phenolcontent, total flavonoids content and antioxidant potential. *Journal of food science and technology (Iran)*, 16(87), 291-304.
8. Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. and Fallah, F. (2019). Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 875-883.
9. Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial pathogenesis*, 136, 103716. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103716
10. Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M. (2017). Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *11*(2), 847-863 . https://doi.org/10.1007/s11694-016-9456-3
11. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M. M., & Vasiee, A. (2013). Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms “in vitro”. *Archives of Advances in Biosciences*, 4(3), 89-99.
12. Alizadeh Behbahani, B., Yazdi, F. T., Shahidi, F., Noorbakhsh, H., Vasiee, A., & Alghooneh, A. (2018). Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic bacteria .*Microbial pathogenesis*, *114*, 225-232. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.004
13. Barzegar, H., Behbahani, B. A., & Mehrnia, M. A. (2020). Quality retention and shelf life extension of fresh beef using Lepidium sativum seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. *Food Science and Biotechnology*, 29(5), 717-728. https://doi.org/10.1007/s10068-019-00715-4
14. Barzegar, H., Mehrnia, M. A., & Alizadeh Behbahani, B. (2017). Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum Lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. *Journal of Applied microbiology in food industries*, *16*(90), 113-125.
15. Benavente-Garcıa, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., & Del Rio, J. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves. *Food Chemistry*, *68*(4), 457-462. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00221-6
16. Bisignano, G., Tomaino ,A., Cascio, R. L., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of pharmacy and pharmacology*, *51*(8), 971-974. https://doi.org/10.1211/0022357991773258
17. Del Río, J., Báidez, A., Botía, J., & Ortuno, A. (2003). Enhancement of phenolic compounds in olive plants (Olea europaea L.) and their influence on resistance against Phytophthora sp. *Food Chemistry*, *83*(1), 75-78. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00051-7

18. Falah, F., Shirani, K., Vasiee, A., Yazdi, F. T., & Behbahani, B. A. (2021). In vitro screening of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of Echinops setifer extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 35*, 102102. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102102
19. Hayes, J., Allen, P., Brunton, N., O'grady, M., & Kerry, J. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry, 126*(3), 948-955. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.092
20. Jafarian, P., Asefi, N., & Teimori, R. (2014). Phenolic compounds content in leaf of different varieties of olive and its effect on stability of rapeseed oil, *Journal of food research*. 24(3), 307-314.
21. Karametjo, A., Hissari, J., Azadmard Demirchi, S., Prophet Doost, S., & Nemati, M. (2013). Antioxidant effect of olive leaf extract on butter stability. *Journal of Food Processing and Preservation*, 5(1), 81-94.
22. Keramatjou., E., Hesari, J., Azadmard-Damirchi., S., & Peighambardoust., S.H. (2013). Antioxidant effect of olive leaf on stability of butter. *Journal of Food Processing and Preservation, 5*(1), 81-94.
23. Kiarsi, Z., Hojjati, M., Behbahani, B. A., & Noshad, M. (2020). In vitro antimicrobial effects of *Myristica fragrans* essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 40(3), e12782. https://doi.org/10.1111/jfs.12782
24. Kiritsakis, K., Kontominas, M., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas ,A., & Kiritsakis, A. (2010). Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 87*(4), 369-376. https://doi.org/10.1007/s11746-009-1517-x
25. Lee, O.-H., & Lee, B.-Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in Olea europaea leaf extract. *Bioresource technology, 101*(10), 3751-375. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.052
26. Lins, P. G., Pugine, S. M. P., Scatolini, A. M., & de Melo, M. P. (2018). In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. *Heliyon, 4*(9), e00805. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00805
27. Majeed, M., & Prakash, L. (2006). Natural antimicrobials and preservatives: An emerging trend in personal care. *Soap Perfumery and Cosmetics, 1*, 87-92 .
28. Mallakian, S., Elhami Rad, A., Beyg Babaei, A., & Mohammadi, M. (2019). Antibacterial properties of olive leaf extracts extracted by subcritical water method on food borne pathogen. *Journal of Applied microbiology in food industries*, 5(2), 27-38.
29. Najafian, L., Haddad Khodaparast, M., & Alireza Qods Vali, A. (2007). Olive oil extraction from three olive varieties using enzyme processing. *Journal of food science and technology (Iran)*, 4(12), 45-53.
30. Noktehsanj Avval, M., Jahed, A., Mahdian, R., & Azari Anpar, M. (2018). Evaluation of the effect of olive leaf extract as a beneficial compound on the physicochemical, microbial and sensory characteristics of pulped tomato juice drink. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 10(4), 119-136.
31. Noshad, M., Hojjati, M., & Behbahani, B. A. (2018). *Black Zira* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microbial pathogenesis, 116*, 153-157. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.026
32. Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., . . . Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules, 12*(5), 1153-1162. https://doi.org/10.3390/12051153
33. Rafiee, Z., Jafari, S. M., Khomeiri, M., & Alami, M. (2011). Effect of variety and method of extraction on antioxidant and antimicrobial activity of olive leaf extracts. *Iranian Food Science & Technology Research Journal, 6*(4), 297-308.
34. Romani, A., Ieri, F., Urciuoli, S., Noce, A., Marrone, G., Nediani, C., & Bernini, R. (2019). Health effects of phenolic compounds found in extra-virgin olive oil, by-products, and leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients, 11*(8), 1776. https://doi.org/10.3390/nu11081776
35. Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A., & Boas, L. V. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International, 12*(5), 385-395. https://doi.org/10.1177/108201320607016
36. Sosani Gharibvand, Z., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Jooyandeh, H. (2020). Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity and cytotoxic effect of *Callistemon Citrinus* aqueous extract on cell line ht29: a laboratory study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 19*(5), 463-484.
37. Tabatabaei Yazdi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on Gram positive and Gram negative bacteria "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4), 56-62.
38. Tabatabaei Yazdi, F., Alizadeh Behbahani, B., Vasiee, A. R., Mortazavi, S. A., & Shahidi, F. (2018). Evaluation antioxidant activity, phytochemical constituents and antimicrobial of *Mentha Piperita* essential oil on some infectious and poisonous microorganisms. *Journal of food science and technology (Iran)*, 15(76), 67-76.

39. Tabatabai Yazdi, F., Ali Zadeh Behbahani, B., Alghoneh, A., & Zanganeh, H. (2016). Optimization of extraction of Mespilus germanica by mixture design and investigation of its effect on Infectious Microorganisms “in vitro”. *Journal of food science and technology (Iran)*, *13*(52), 131-145.